

Bydgoszcz 05.07.2022

dr hab. Przemysław Kosobucki, prof. PBS

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej pt.:

*NOWE PROCEDURY IZOTACHOFORETYCZNEGO OZNACZANIA TRYPTOFANU, KWASU
GLUTAMINOWEGO I WITAMIN B₁, B₆, B₉ W ŻYWNOŚCI*

autorstwa mgr Sylwii Kowalskiej

wykonanej w Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu w Katedrze Chemii Analitycznej
i Spektroskopii Stosowanej

pod kierownictwem naukowym dr hab. Anety Jastrzębskiej, prof. UMK

Przedstawiona do recenzji praca dotyczy opracowania nowych, prostych i ekologicznie przyjaznych metod oznaczania tryptofanu, kwasu glutaminowego oraz witamin B₁, B₆, B₉ z wykorzystaniem izotachoforezy w żywności.

Celowość podjętych badań

Prawidłowe funkcjonowanie człowieka wymaga dostarczania żywności. Zgodnie z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego z 28.01.2002 roku „Żywność (środek spożywczy) oznacza jakiegokolwiek substancje lub produkty, przetworzone, częściowo przetworzone lub nieprzetworzone, przeznaczone do spożycia przez ludzi, lub których spożycia przez ludzi można się spodziewać. Środek spożywczy obejmuje: napoje, gumę do żucia i wszelkie substancje, łącznie z wodą, świadomie dodane do żywności podczas jej wytwarzania, przygotowania lub obróbki”.

Żywność stanowi więc nieodzowny element życia codziennego. Konieczne jest poznanie składu jakościowego i ilościowego żywności, w celu prawidłowego zbilansowania diety. W ostatnich latach obserwuje się konieczność intensyfikacji produkcji żywności wynikającą ze wzrostu liczby ludności. Ta intensyfikacja wymaga wielu zabiegów, w tym np. chemizacji rolnictwa (nawozy, środki ochrony roślin). Efektem tych działań może być zanieczyszczenie żywności i kontrola jej jakości jest zagadnieniem bardzo ważnym z praktycznego punktu widzenia.

Dlatego też poszukiwanie prostych, łatwych do zaadaptowania oraz przyjaznych środowisku metod badania żywności jest konieczne i stanowi kierunek badań wielu ośrodków naukowych na całym świecie. W ten trend badań wpisuje się tematyka badawcza Doktorantki i jest ona z naukowego punktu widzenia zasadna. Do realizacji swoich celów Pani mgr Sylwia Kowalska wykorzystywała izotachoforezę (ITP).

Formalna ocena pracy

Przedstawiona do oceny praca jest obszerną, przedstawioną na 206 stronach pozycją.

Rozprawa doktorska składa się dwóch głównych części. Część literaturowa zawiera dziewięć rozdziałów wprowadzających czytelnika w tematykę badań (m.in. charakterystyka aminokwasów i witamin z grupy B, metody ich analizy w żywności, krótkie omówienie izotachoforezy i jej zastosowań w analizie żywności). Część literaturową kończy cel pracy, w którym Doktorantka w sposób jasny i syntetyczny przedstawia główne cele badawcze. Część eksperymentalna pracy zawiera osiem rozdziałów (m.in. wykaz skrótów, odczynników, aparatury oraz omówienie badanych próbek; omówienie doboru warunków separacji izotachoforetycznej; uwiarygodnienie (walidację) zaproponowanych procedur analitycznych; omówienie analizy ciekłych i stałych produktów żywnościowych (piwa, napoje piwne, mąki). Całość części eksperymentalnej kończy porównanie nowych, opracowanych przez Panią Sylwię Kowalską metod z metodą referencyjną (w tym przypadku chromatografią ciecząową) stosowaną w rutynowej analizie tryptofanu, kwasu glutaminowego oraz witamin B₁, B₆, B₉. W dalszej części recenzowana rozprawa zawiera: podsumowanie i wnioski, streszczenie (w tym w języku angielskim), bibliografię (335 starannie wyselekcjonowanych pozycji literaturowych), załączniki (spis ilustracji i tabel, dorobek naukowy Doktorantki) oraz materiały uzupełniające.

Układ pracy jest przejrzysty, praca pod względem technicznym jest napisana starannie.

Zakres tematyki badawczej i merytoryczna ocena pracy

Autorka recenzowanej rozprawy podjęła się opracowania nowych procedur badawczych do jakościowej i ilościowej analizy wybranych aminokwasów i witamin z grupy B. Pani mgr Sylwia Kowalska zaproponowała do tego celu wykorzystanie izotachoforezy (ITP). ITP w Polsce nie jest techniką analityczną często wykorzystywaną w praktyce laboratoryjnej. Spowodowane jest to głównie trudnościami w doborze warunków rozdzielania izotachoforetycznego, a w szczególności z właściwym doбором elektrolitu wiodącego (LE) i elektrolitu kończącego (TE).

Zakres badań przeprowadzonych przez Autorkę recenzowanej rozprawy zawierał w mojej ocenie cztery główne cele badawcze:

1. *dobór układu elektrolitów* (wybór jonów wiodących i kończących, wybór przeciwjonów i odpowiedniego pH, wybór dodatków antykonwekcyjnych, dostosowanie programu czasowo-prądowego). Ten etap badań był szczególnie pracochłonny i Doktorantka wywiązała się z niego wzorowo. W sumie zostało przetestowanych 21 układów elektrolitów. Na tym etapie pięć układów spełniało założone kryteria wyboru i zostały one wykorzystane do dalszych badań.
2. *uwiarygodnienie (walidacja) zaproponowanych procedur analitycznych*. Autorka recenzowanej rozprawy wyznaczyła wybrane parametry walidacyjne (selektywność, liniowość, granica wykrywalności, granica oznaczalności, precyzja, dokładność, efekt matrycy). Otrzymane wyniki zostały poddane analizie statystycznej i wyznaczone zostały wspomniane wyżej parametry. Potwierdziły one statystycznie akceptowalną dokładność zaproponowanych procedur analitycznych. Po tym etapie badań Pani mgr Sylwia Kowalska zaproponowała cztery układy elektrolitów do badań końcowych.
3. *analiza próbek rzeczywistych* (nie tylko modelowych) o złożonej matrycy. Wszyscy chemicy analitycy doskonale wiedzą, że etap pobierania i przygotowania próbki do właściwej analizy jest etapem krytycznym i często najbardziej czasochłonnym dla całej procedury analitycznej. Pani mgr Sylwia Kowalska przedstawiła sposób przygotowania próbek ciekłych (piwa i napoje piwne) oraz próbek stałych (mąka grochowa i mąka pszenna) przed finalnym oznaczaniem tryptofanu, kwasu glutaminowego oraz witamin B₁, B₆, B₉ z wykorzystaniem izotachoforezy.

4. *cennym i istotnym elementem recenzowanej rozprawy jest porównanie zaproponowanej procedury oznaczania tryptofanu, kwasu glutaminowego oraz witamin B₁, B₆, B₉ z wykorzystaniem izotachoforezy z referencyjną metodą stosowaną w rutynowych badaniach przez wyspecjalizowane laboratoria badania żywności. W tym przypadku Doktorantka wybrała wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC). Wyniki otrzymane z ITP oraz HPLC po statystycznym ich opracowaniu wskazują, że izotachoforetyczna procedura oznaczania wybranych aminokwasów i witamin może być konkurencyjna do metod chromatograficznych.*

Podsumowując, praca zawiera szeroki i bogaty materiał eksperymentalny. Przeprowadzone przez Panią mgr Sylwię Kowalską badania były szczegółowo zaplanowane i realizowane systematycznie. Otrzymane wyniki zostały opisane i przedstawione w tabelach oraz na rysunkach w sposób niebudzący wątpliwości.

Nadrzędnym celem recenzowanej rozprawy doktorskiej Pani Sylwii Kowalskiej było opracowanie nowych procedur izotachoforytycznego oznaczania tryptofanu, kwasu glutaminowego oraz witamin B₁, B₆, B₉ w żywności. Cel ten został w pełni osiągnięty. Podjęta tematyka badań jest aktualna i ma duży potencjał aplikacyjny.

Na podkreślenie zasługuje duża aktywność naukowa mgr Sylwii Kowalskiej, która jest współautorem 7 prac z listy JCR (sumaryczny IF = 24,844). Badania wchodzące ściśle w zakres recenzowanej rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w trzech pracach. Dodatkowo trzy prace zostały opublikowane w materiałach pokonferencyjnych. Doktorantka wyniki swoich prac prezentowała na konferencjach krajowych i międzynarodowych w postaci: komunikatów (8) i posterów (21). Realizowała także pięć projektów badawczych finansowanych przez Wydział Chemii UMK. Odbiła staż naukowy w Dziale Zapewnienia Jakości w Browarze w Sierpcu.

Aktywność Pani Kowalskiej została zauważona i nagrodzona wyróżnieniem Rektora UMK w Toruniu za osiągnięcia w dziedzinie naukowo-badawczej.

Jak w większości rozpraw doktorskich, także i w tej można doszukać się pewnych nieściśłości i niewielkich uchybień, nie mających wpływu na wysoki merytoryczny poziom pracy. Jednakże zadaniem Recenzenta jest je znaleźć, przedstawić Doktorantowi i oczekiwać wyjaśnień podczas publicznej obrony rozprawy.

1. generalnie podpisy pod izotachofogramami powinny wg mojej opinii zawierać informację o trybie pracy (ITP czy ITP-ITP) i warunkach detekcji (natężenie prądu),
2. str. 7, 5,6,7,8-tetrahydrobiopteryna nie jest witaminą B₉; to jest sapropteryna,
3. str. 30, *spektroskopia ultrafioletowa (UV)*, skrót myślowy Autorki,
4. str. 31, *oraz w trybie kapilarnym (CE)*, z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej,
5. str. 35, *...ilość procesów...*, ilość powtórzeń,
6. str. 48 i pozostałe, problem z obowiązującą nomenklaturą chemiczną, jest *siarczany*, powinno być *siarczany(VI)*,
7. str. 53, Tabela 7 (nowy aminokwas *Tea*),
8. str. 57, niefortunne: *Również w tym przypadku kierowałam się poszukiwaniem poziomu analitów w szeroko konsumowanych napojach w Polsce i na świecie*,
9. str. 62, brakuje informacji o oprogramowaniu (ITPWin czy ITPPro?), czy pracowała Pani na aparacie EA 102 czy EA 202M?,
10. str. 77, niefortunne: *Obecność jonów węglanowych w przypadku jednoczesnej analizy Trp, Glu i witaminy B₉ nie miała wpływu na mierzony parametr jakościowy i ilościowy*,
11. str. 89, i kolejne: *Wartości parametrów izotachofogramów, ...*,
12. str. 121, czy wirowanie przy 9000 obr./min nie usuwało mętności? Czy tabela 25 przedstawia obserwacje próbek przed wirowaniem? Może brak mętności w przypadku

- HClO₄ wynikał z silnie utleniających właściwości chemicznych tego kwasu. Proszę o komentarz.
13. str.122, *lepkie polimery* (znowu określenie żargonowe),
 14. str. 153, *W wyniku przeprowadzonej procedury statystycznej...*, raczej analizy statystycznej,
 15. zdarzały się drobne literówki typu *zostawanie*, powinno być zastosowanie (str. 55).

Raz jeszcze chciałbym podkreślić, że ranga tych uchybień nie jest znacząca.

Wniosek końcowy

Rozprawa potwierdza umiejętność analizy danych literaturowych oraz samodzielnego planowania i prowadzenia badań naukowych przez Doktorantkę. Wyczerpuje to wymagania art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789). Wniosuję zatem o dopuszczenie Pani mgr Sylwii Kowalskiej do kolejnych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora nauk chemicznych.

Mając na uwadze ponadprzeciętny dorobek naukowy (na tym etapie kariery naukowej), dojrzałość naukową oraz duży potencjał aplikacyjny pracy wniosuję do Rady Wydziału Chemii UMK o wyróżnienie pracy Pani mgr Sylwii Kowalskiej.


Dr hab. Przemysław Kosobucki
••• prof. PBS